

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

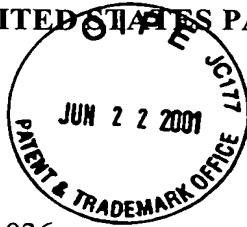
In re Application of :

Peter Schubert et al.

Serial No. : 09/372,036

Filed : August 11, 1999

For : PROCESS AND AGENTS FOR DETECTING LISTERIAS



RECEIVED

JUN 25 2001

TECH CENTER 1600/2900

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D. C. 20231

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of each of the below-identified document(s),
benefit of priority of each of which is claimed under U.S.C. § 119:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>FILING DATE</u>
Germany	P 42 19 111.4	June 11, 1992
Germany	P 42 39 567.4	November 25, 1992

Acknowledgment of the receipt of the above document(s) is requested.

No fee is believed to be due in association with this filing, however, the Commissioner is hereby authorized to charge fees under 37 CFR 1.16 and 1.17 which may be required to facilitate this filing, or credit any overpayment to Deposit Account #13-3402.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Nancy Axelrod".

Nancy J. Axelrod
Registration No. 44,014
Patent Agent

MILLEN, WHITE, ZELANO
& BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
2200 Clarendon Blvd. Suite 1400
Arlington, Virginia 22201
Telephone: (703) 243-6333
Facsimile: (703) 243-6410

Attorney Docket No.: MERCK-1694 D2

Date: June 22, 2001

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



RECEIVED

JUN 25 2001

TECH CENTER 1600/2900

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: P 42 19 111.4

Anmeldetag: 11. Juni 1992

Anmelder/Inhaber: Merck Patent GmbH, Darmstadt/DE

Bezeichnung: Verfahren und Mittel zum Nachweis von Listerien

IPC: C 07 K 15/28

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayer

Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung

6100 D a r m s t a d t

den 9.06.1992

Verfahren und Mittel zum Nachweis von Listerien

Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung

6100 D a r m s t a d t

5

Verfahren und Mittel zum Nachweis von Listerien

Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von
10 Bakterien der Gattung Listeria, insbesondere von L. monocytogenes.

Die Mitglieder der Gattung Listeria sind grampositive
stäbchenförmige Bakterien, die ubiquitär vorkommen. Zu dieser
15 Gattung gehören sieben verschiedene Arten: L. monocytogenes,
L. ivanovii, L. seeligeri, L. welshimeri, L. innocua, L. murrayi und L. grayi. Von diesen ist nur L. monocytogenes pathogen für Menschen, gefährdet sind insbesondere Neugeborene, Schwangere und Ältere, sowie Patienten unter Immunsuppression.
20 Häufig verlaufen Infektionen mit L. monocytogenes tödlich.

Die Ursache für Infektionen mit Listerien sind häufig kontaminierte Lebensmittel, in denen sich die Keime selbst bei
25 niedrigen Temperaturen um 4 °C vermehren können. So wurden verschiedene Listerien-Epidemien auf den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln, wie z.B Rohmilch, Käse oder Krautsalat, zurückgeführt. Schnelle Nachweisverfahren für den Nachweis von Listerien, insbesondere in Lebensmitteln oder
30 klinischen Proben, sind also dringend erforderlich. Diese

Verfahren müssen zudem zwischen *L. monocytogenes* und den nicht-humanpathogenen Arten unterscheiden können. Weiterhin ist erforderlich, daß alle Varianten der humanpathogenen Art *L. monocytogenes* nachgewiesen werden können.

5

Der Nachweis von *L. monocytogenes* erfolgt in bekannter Weise mittels Verfahren, die auf der Kultur der Mikroorganismen beruhen. Das in Int. J. Food Microbiol. 4 (1987), 249-256 beschriebene Verfahren dauert zwei Wochen. Ein etwas schnelleres Verfahren wird von der International Dairy Foundation (IDF) empfohlen; es dauert aber mindestens 6-8 Tage. Beide Verfahren sind wegen ihrer Dauer für eine schnelle Identifizierung ungeeignet. Beide Verfahren sind zudem arbeitsintensiv, da für die Gewinnung von Einzelkolonien Nährmedien mehrfach inokuliert werden müssen, und da anschließend die Isolate mittels biochemischer und serologischer Untersuchungsmethoden charakterisiert werden müssen.

Die bisher auf dem Markt befindlichen immunologischen Tests dauern zwar nur wenige Stunden, erlauben jedoch nicht die wichtige Unterscheidung zwischen verschiedenen Arten von Listerien. Auch bei diesen Verfahren wird eine zweitägige Voranreicherungskultur benötigt.

In Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988), 2933-2937 ist eine Methode beschrieben, bei der *L. monocytogenes* mit Hilfe von synthetischen Oligodesoxyribonukleotid-Sonden spezifisch nachgewiesen wird. Jedoch sind die verwendeten Sonden nicht ausreichend spezifisch, da sie auch mit der nicht humanpathogenen Art *L. seeligeri* reagieren. Auch für dieses Verfahren ist eine vorherige Vermehrung der Keime notwendig:

Lebensmittelproben bzw. deren Verdünnungen werden auf Agarplatten ausgestrichen, die beimpften Platten werden bebrütet und anschließend mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde im colony Hybridisierungsverfahren untersucht. Der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie. Auch diese Methode ist arbeits- und zeitaufwendig.

In Infect. Immun. **58**, 1943-1950 (1990) wird die DNA-Sequenz des iap-Gens (invasion-associated protein) von *L. monocytogenes* beschrieben. Dieses Gen kodiert ein Protein, das auch unter der Bezeichnung p60 bekannt ist, und das in Varianten in allen *Listeria* Arten vorkommt. Bei *L. monocytogenes* ist dieses Protein für die Fähigkeit, in tierische Zellen einzudringen, verantwortlich. Ein Polynukleotid (400 Basen) mit einer Teilsequenz aus diesem Gen ist als DNA-Sonde geeignet, um *L. monocytogenes* von anderen Organismen zu unterscheiden.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction: PCR) erlaubt die in-vitro Vermehrung von Nukleinsäuren, eine Vorkultur ist bei diesem Verfahren im allgemeinen nicht notwendig. Damit die Reaktion gestartet werden kann, werden kurze Nukleinsäurestücke (primer) benötigt, die den zu vermehrenden Genomabschnitt eingrenzen. Üblicherweise werden zwei Primer benutzt, die mit jeweils einem Nukleinsäurestrang hybridisieren. Einer der Primer besitzt deswegen die Komplementärsequenz des jeweiligen Genabschnittes. Die Auswahl dieser Primer bestimmt die Spezifität der Nachweisreaktion. Für den Nachweis von *L. monocytogenes* ist dieses Verfahren in Appl. Environmental Microbiology **57**, 606-609 (1991), in Letters Appl. Microbiol. **11**, 158-162 (1990) und in J. Appl. Bact. **70**, 372-379 (1991) beschrieben. Dort finden sich nähere

Angaben zu den Einzelheiten dieser Verfahren. Die DNA-Primer binden an das Gen für Listeriolysin, dem Listeria- Hämolysin. Die Spezifität dieser Primer ist, wie aus Anmerkungen in J. Appl. Bact. 70 hervorgeht, zumindestens unsicher: L. seeligeri läßt sich nicht sicher von L. monocytogenes unterscheiden. Mit Hilfe der PCR-Technik ist somit der sichere Nachweis von L. monocytogenes bisher nicht möglich.

Polyklonale Antikörper gegen L. monocytogenes p60 reagieren auch mit dem Protein p60 von anderen, apathogenen Listerienarten. Derartige Antikörper sind deswegen ungeeignet, L. monocytogenes durch immunologische Verfahren spezifisch nachzuweisen. Es ist zwar prinzipiell möglich, ein derartiges polyvalentes Antiserum durch spezifische Absorption von störenden Antikörperfraktionen zu reinigen: Dazu wird Protein p60 von allen anderen Listeria-Arten an Träger kovalent gebunden. Die nicht erwünschten Antikörperfraktionen lassen sich spezifisch absorbieren; übrig bleibt ein Antiserum, das nur noch mit Protein p60 aus L. monocytogenes reagiert. Diese Methode zur Gewinnung eines L. monocytogenes spezifischen Serums ist aufwendig: Man benötigt erhebliche Mengen von dem polyvalenten Antiserum als Ausgangsmaterial, sowie zusätzlich die iap-Genprodukte p60 von allen Listerienarten. Bei der Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen Protein p60 würde dieser hohe Materialbedarf nicht auftreten, jedoch ist die Entstehung von Antikörpern gegen bestimmte Epitope zufallsbedingt: Zunächst muß eine ungeheure Zahl von antikörperproduzierenden Zellklonen hergestellt werden, aus denen dann geeignete Klone ausgewählt werden müssen. Es ist bisher nicht möglich, gezielt Antikörper gegen Epitope zu gewinnen, die für L. monocytogenes spezifisch sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, verbesserte Mittel und Methoden für die Differenzierung von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere für den Nachweis von Bakterien der Art *L. monocytogenes* bereitzustellen. Insbesondere werden
5 erfindungsgemäß für die PCR-Technik geeignete Primer-Sequenzen, sowie Peptide zur gezielten Erzeugung von spezifischen Antikörpern, die für den immunologischen Nachweis von Bakterien der Art *L. monocytogenes* geeignet sind, bereitgestellt.

10 Gegenstand der Erfindung sind Primer, ausgewählt aus dem iap-Gen, für die Amplifikation von Nukleinsäuren, beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer als Teilsequenz mindestens eine
15 Sequenz nach einer der Formeln Ia bis Ih und/oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten, wobei vor und/oder hinter dieser Teilsequenz bis zu 20 weitere Nukleotidbausteine gebunden vorliegen können. Derartige Primer sind
geeignet für den Nachweis und die Differenzierung von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere auch der Art *L. monocytogenes* mittels PCR.
20

	AATATGAAAAAAGC	Ia
	GCTTCGGTCGCGTA	Ib
	ACAGCTGGGATTGC	Ic
25	ACTGCTAACACAGCT	Id
	TAACAGCAATTCAAG	Ie
	CTGAGGTAGCGAGC	If
	AGCACTCCAGTTGTTA	Ig
	GCAGTTTCTAAACCT	Ih
30		

Besonders bevorzugt sind dabei Primer, die eine Sequenz nach einer der Formeln IIa bis IIh und/oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten.

5

GTCGACTGAATATGAAAAAGCAAC	IIa
TTGGCTTCGGTCGCGTAGAATTCATA	IIb
GCTACAGCTGGGATTGCGGT	IIc
CAAACTGCTAACACAGCTACT	IId
CAATAACAGCAATTCAAGTGC	IIe
TAAGTGAAGTAGCGAGCGAA	IIf
ACTAGCACTCCAGTTGTAAAC	IIg
CCAGCAGTTTCTAAACCTGCT	IIh

10

15 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Peptide, ausgewählt aus dem Protein p60, die als Teilsequenz mindestens eine Sequenz nach einer der Formeln IIIa bis IIId enthalten, wobei vor und/oder hinter dieser Teilsequenz bis zu sieben Aminosäuren peptidisch gebunden vorliegen können.

20

SerThrProValAlaProThr	IIIa
ThrGlnAlaThrThrProAlaProLysVal	IIIb
AlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAla	IIIc
GlnGlnThrAlaProLysAlaProThr	IIId

25

Besonders bevorzugt sind dabei Peptide mit einer Sequenz nach einer der Formeln IVa bis IVf.

30

ValSerThrProValAlaProThrGln	IVa
ThrThrGlnAlaThrThrProAlaProLysValAla	IVb
LeuAlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAlaThr	IVc

GlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu	IVd
SerThrProValAlaProThrGlnGluValLysLys	IVe
ProValAlaProThrGlnGluValLysLys	IVf

5 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines der genannten Peptide mit einer Teilsequenz nach einer der Formeln IIIa bis IIIId zur Herstellung von immunogenen Konjugaten. Besonders bevorzugt sind für diesen Verwendungszweck Peptide mit einer Sequenz nach einer der Formeln IVa bis IVf.

10 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Antikörper, der spezifisch gegen ein Epitop gerichtet ist, das von einem Peptid nach einer der Formeln IIIa-IIIId, bevorzugt nach einer der Formeln IVa-IVf, gebildet wird.

15 Gegenstand der Erfindung ist schließlich die Verwendung eines Primers, der eine Teilsequenz nach einer der Formeln Ia-Ih oder bevorzugt eine Sequenz nach einer der Formeln IIa-IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthält, für den

20 Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels eines Primers, der eine Teilsequenz nach einer der Formeln Ia-Ih oder bevorzugt

25 eine Sequenz nach einer der Formeln IIa-IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthält.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung eines Antikörpers, der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Formeln IIIa-IIIId oder IVa-IVf

30 gerichtet ist, für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* mittels eines Antikörpers, der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Formeln IIIa-IIIId oder IVa-IVf gerichtet ist.

5

Gegenstand der Erfindung sind schließlich Testzusammenstellungen zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere der Art *L. monocytogenes*, mittels Amplifikation von Nukleinsäuren, beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, die einen Primer mit einer Teilsequenz nach einer der Formeln Ia-Ih oder bevorzugt mit einer Sequenz nach einer der Formeln IIa-IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten.

10

Gegenstand der Erfindung sind ferner Testzusammenstellungen zum immunologischen Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes*, in denen ein Antikörper gegen ein Epitop nach einer der Formeln IIIa-IIIId und/oder nach einer der Formeln IVa-IVf enthalten ist.

15

Figur 1 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung von Amplifikationsprodukten; die experimentellen Einzelheiten sind in Beispiel 8 dargestellt.

20

25

30

Die Spuren S und 1 bis 7 des Elektrophoresegels dargestellt
in Figur 1 enthalten folgende Proben:

5 S Molekülgrößenstandard (SppI DNA hydrolysiert mittels
 EcoRI) mit (von unten nach oben) 380, 480, 660, 870, 1090
 und 1330 Basenpaaren Länge;

1 bis 7:

10 Amplifikationsprodukte von Proben, die verschiedene
 Listerien-Arten enthalten:

 1 L. grayi
 2 L. murrayi
 3 L. monocytogenes
 4 L. innocua
15 5 L. ivanovii
 6 L. seeligeri
 7 L. welshimeri

20

25

30

Die Erfindung wird im folgenden näher beschrieben. Dabei wird in der Regel auf Einzelheiten von biochemischen, immunologischen und molekularbiologischen Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, und deren Einzelheiten in der Literatur
5 beschrieben sind, nicht näher eingegangen. Bei diesen Verfahren kann man auch von an sich bekannten, hier nicht näher beschriebenen Varianten Gebrauch machen.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide nach den Formeln Ia-Ih
10 und IIa-IIh sind als Primer für Nukleinsäureamplifikationsmethoden und somit zum spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria geeignet. Ihre Sequenzen sind in üblicher Weise vom 5'-Ende zum 3'-Ende geschrieben dargestellt. In Abhängigkeit von den Erfordernissen des jeweils
15 verwendeten Amplifikationssystems werden entweder Desoxyribonukleotide oder auch Ribonukleotide mit den erfindungsgemäßen Sequenzen eingesetzt. Im letzteren Fall sind die Thymidinbausteine jeweils durch Uridinbausteine ersetzt. Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, daß häufig der Austausch von einer
20 oder weniger Basen in eine Nukleotidsequenz deren biologische Eigenschaften nicht verändert. Deswegen umfassen die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen auch solche, die durch Basenaustausch aus den Sequenzen Ia-Ih und IIa-IIh abgeleitet sind, und die biologisch dieselbe Wirkung wie der jeweilige
25 Primer mit der Ursprungssequenz zeigen. Da üblicherweise je ein Primer mit jeweils einem der DNA-Stränge reagieren soll, wird einer der Primer in der komplementären Sequenz eingesetzt. Die komplementäre Sequenz ergibt sich in bekannter Weise nach den Regeln der Basenpaarung.

30

Basierend auf der jeweiligen Sequenz können die erfindungs-
gemäßen Oligonukleotide nach dem Fachmann bekannten Verfah-
ren, beispielsweise der Phosphotriester- oder der Phospho-
amidit-Methode, synthetisiert werden. Bevorzugt wird die
5 Phosphoamidit-Methode benutzt, insbesondere unter Verwendung
von mechanisierten Synthetizern. Die Methode ist in Tetra-
hedron Lett. (1981) 22 : 1859-1862 beschrieben. Weitere
Einzelheiten derartiger Syntheseverfahren sind beispielsweise
in Winnacker, E.L. (1985) Gene und Klone, Seite 44-61 (VCH-
10 Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim), beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Primer sind geeignet für DNS-Amplifika-
tion, beispielsweise mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction
(PCR). Dazu wird die DNS durch Erwärmen zunächst in die
15 Einzelstränge zerlegt. Es werden zwei Primer verwendet, die
jeweils mit dem homologen DNS-Abschnitt auf jeweils einem
DNS-Strang hybridisieren. Der Genomabschnitt, der zwischen
diesen beiden Primern liegt, wird vermehrt. Die an die DNS
angelagerten Primer stellen die Startpunkte für die Amplifi-
20 kation dar. Eine Polymerase, bevorzugt taq-DNA-Polymerase,
ergänzt anschließend in Gegenwart der vier Nukleotidtri-
phosphate den zweiten Strang entsprechend der Sequenz der
ursprünglichen DNA. Anschließend werden die entstandenen
Doppelstränge wieder durch Erwärmen in die Einzelstränge
25 zerlegt. Dieser Amplifikationszyklus kann mehrfach wiederholt
werden. Nach einer ausreichenden Anzahl von Amplifikations-
zyklen kann die amplifizierte Nukleinsäure mittels bekannter
Methoden nachgewiesen werden. Dazu kann die DNS mittels Elek-
trophorese aufgetrennt, anschließend mit Ethidiumbromid ange-
30 färbt und schließlich durch Fluoreszenz mittels UV-Anregung
nachgewiesen werden. Möglich ist auch der Nachweis mittels

DNS-Hybridisierung. Die Einzelheiten geeigneter Amplifikations- und Nachweismethoden sind auch in Übersichtsartikeln, z.B. Innis et al. (eds.) PCR Protocols (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers) beschrieben. Ebenso sind andere Nukleinsäureamplifikationsverfahren, bei denen die erfindungsgemäßen Primer benutzt werden können, aus der Literatur bekannt. Zu diesen gehört die Ligase-Ketten-Reaktion, beschrieben von Bond, S. et al. (1990), Seite 425-434 bei Raven Press (New York, USA).

Die Auswahl der Primer nach den bevorzugten Formeln IIa-IIh bestimmt die Lage der Startpunkte auf dem iap-Gen und somit die Spezifität der Nachweisreaktion: So erwiesen sich Kombinationen von Primern ausgewählt aus der Sequenz des iap-Gens als unspezifisch und folglich ungeeignet für den Nachweis von Listerien mittels DNA-Amplifikation (siehe dazu beispielsweise Spalte F in Tabelle 1). Jedoch erwiesen sich andere ausgewählte Kombinationen als spezifisch für die Gattung Listeria, andere für Gruppen von Listeria-Arten, wieder andere für einzelne Listeria-Arten. Insgesamt ist die Auswahl und die Zusammenstellung der Primer also kritisch. Die Auswahl eines der beiden Primer ist stets besonders kritisch, während der zweite Primer eher variiert werden kann, ohne die Spezifität der Nachweisreaktion nennenswert zu verändern. Folglich kann nach der Lehre der vorliegenden Erfindung für diesen zweiten Primer durchaus auch eine Sequenz gewählt werden, die nicht einer der Formeln Ia-Ih oder IIa-IIh entspricht.

Erfindungsgemäß wird zumindestens einer der Primer aus den Formeln Ia-Ih oder bevorzugt aus den Formeln IIa-IIh ausgewählt. Der zweite Primer beeinflusst, wie bereits erläutert,

die Spezifität der Amplifikationsreaktion wesentlich weniger als der erste Primer. Bevorzugt werden jedoch Kombinationen, bei denen beide Primer aus den Formeln Ia-Ih oder IIa-IIh ausgewählt werden. Beispiele für derartige bevorzugte Kombinationen sind (typische Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt):

- a) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIc mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von Listerien amplifiziert, nicht jedoch die DNS von anderen Bakterienarten (siehe Spalte D in Tabelle 1).
- b) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIId mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von *L. monocytogenes* amplifiziert, nicht jedoch die DNS von anderen Listerien oder anderen Bakterien (siehe Spalte B in Tabelle 1).
- c) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIIf mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von bestimmten Listerien-Arten amplifiziert, nämlich ausschließlich von *L. seeligeri*, *L. welshimiri* und *L. ivanovii*. Mithin ist ein gruppenspezifischer Nachweis möglich (siehe Spalte E in Tabelle 1).
- d) Ein anderes Beispiel für einen gruppenspezifischen Nachweis besteht in der Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIh mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb: Es wird nur die DNS von *L. grayi* und *L. murrayi* amplifiziert (siehe Spalte G in Tabelle 1).

e) Da die Amplifikationsprodukte verschiedener Listerien-
Arten unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen,
können durch eine Kombination von mehreren Primern (nach
Formeln IIId, IIIf, IIg und IIh) mit der Komplementär-
sequenz von Formel IIb mit einer einzigen Polymerasereak-
tion Bakterien der Gattung Listeria differenziert werden.
Einzelheiten dieser Weiterentwicklung der Polymerasetech-
nik sind aus Beispiel 8 ersichtlich (siehe Spalte H in
Tabelle 1, sowie Figur 1).

Die erfindungsgemäßen Peptide nach den Formeln IIIa-IIIId und
IVa-IVf können als immunogene Peptide zur Erzeugung von Anti-
körpern dienen und ermöglichen somit einen spezifischen
immunologischen Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

Dem Fachmann ist bekannt, daß häufig der Austausch von einer
oder wenigen Aminosäuren in einem Peptid dessen biologische
Eigenschaften nicht verändert. Deswegen umfassen die erfin-
dungsgemäßen Peptidsequenzen auch solche, die durch Amino-
säureaustausch aus den Sequenzen IIIa-IIIId und IVa-IVf abge-
leitet sind, und die biologisch dieselbe Wirkung wie die
jeweiligen Peptide mit der Ursprungssequenz zeigen.

Basierend auf der Sequenz der Aminosäuren können die Peptide
nach dem Fachmann bekannten Verfahren, beispielsweise dem
 t_{boc} - oder dem f_{moc} -Verfahren (tert.butyloxycarbonyl-, bzw.
9-fluorenylmethyloxycarbonyl-), synthetisiert werden. Einzel-
heiten dieser Verfahren sind beispielsweise in J. Am. Chem.
Soc. 85, 2149-2154 (1963) und in Synthetic Polypeptides as

30

Antigens (van Regenmortel et al. (eds.) Elsevier 1988 (Band 19 der Buchreihe Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) beschrieben. Bevorzugt wird das f_{moc} -Verfahren, insbesondere mechanisierte Verfahrensvarianten.

5 Einzelheiten des Verfahrens, sowie geeignete Aminosäureschutzgruppen sind dem Fachmann bekannt.

Peptide sind im allgemeinen nicht geeignet, Antikörper zu erzeugen. Werden Peptide jedoch an hochmolekulare Trägersubstanzen gekoppelt, so entstehen immunogene Konjugate. Die
10 erfindungsgemäßen Peptide lassen sich mit bekannten Trägersubstanzen konjugieren. Dazu gehören Polyäthylenglykole, Serumalbumine, KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Hämocyanin von Napfschnecken), Ovalbumin, Glucosedehydrogenase aus *Bacillus*
15 *megatherium* und PPD (purified protein derivative of tuberculin). Bevorzugte Trägersubstanzen sind KLH und Glucosedehydrogenase aus *B. megatherium*.

Außerdem werden zusätzlich häufig Brückenverbindungen (linker) eingesetzt. Dies sind niedermolekulare organische Verbindungen mit mindestens zwei verknüpfbaren funktionellen Gruppen. Geeignete Verbindungen sind dem Fachmann bekannt; dazu gehören beispielsweise: 1,2-Diaminoethan, Bernsteinsäure, β -Alanin, 1,6-Diaminohexan, 6-Aminocapronsäure, Adipinsäure, Cystein. Bevorzugt wird Cystein als Linker eingesetzt, wobei dieser Aminosäurerest bereits bei der Synthese des Peptides eingebaut wird. Zur Herstellung der Bindungen zwischen Peptid und Trägersubstanz werden bevorzugt *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimidester (MBS) eingesetzt.

30

Die genannten immunogenen Konjugate dienen dazu, nach bekannten Verfahren in Versuchstieren Antikörper zu erzeugen.

Üblicherweise werden für diesen Zweck Säugetiere, beispielsweise Schaf, Ziege, Kaninchen oder Mäuse benutzt. Kaninchen sind für die Erzeugung polyklonaler Antikörper bevorzugt. Es ist aber auch möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen immunogenen Konjugate monoklonale Antikörper herzustellen.

Einzelheiten der immunologischen Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Hinweise zur Durchführung dieser Verfahren sind außerdem vielfältig in der Literatur anzutreffen; beispielsweise seien genannt:

- * Antibodies, E. Harlow und D. Lane, Cold Spring Harbor (1988)
- * Woodard, L.F. und Jasman, R.L. (1985) Vaccine 3, 137-144
- * Woodard, L.F. (1989) Laboratory Animal Sci 39, 222-225
- * Handbook of Experimental Immunology (1986) Weir, D.M. et al. eds.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, GB

Zu diesen Verfahren gehören beispielsweise die Konjugations- und Immunisierungsverfahren, sowie die Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern und auch immunologische Nachweisverfahren. Zu den immunologischen Nachweisverfahren, bei denen erfindungsgemäße Antikörper benutzt werden können, gehören bevorzugt Agglutinationsverfahren, immunometrische Nachweisverfahren, die Immuno-Blot-Verfahren und insbesondere die sandwich-(ELISA)-Verfahren.

Es ist dem Fachmann bekannt, daß bei derartigen Verfahren statt der Benutzung eines einzigen Antikörpers, der gegen ein einzelnes Epitop gerichtet ist, eine Mischung von verschiedenen Antikörpern mit verschiedener Spezifität Vorteile, insbesondere bezüglich der Nachweisempfindlichkeit, erbringt. Dies trifft im besonderen für monoklonale Antikörper, aber auch für andere Antikörper zu, die gegen jeweils ein Epitop gerichtet sind. Entsprechend kann es vorteilhaft sein, mehrere Antikörper, die gegen verschiedene Peptidstrukturen nach den Formeln IIIa - IIIId oder IVa - IVf gerichtet sind, für die erfindungsgemäße Verwendung und/oder die erfindungsgemäßen Verfahren zu kombinieren.

Einzelheiten der Herstellung der erfindungsgemäßen Primer und Peptide, sowie ihrer Verwendung sind aus den folgenden Beispielen ersichtlich. Weitere methodische Einzelheiten entnimmt der Fachmann der zitierten Literatur. Die Beispiele sollen den Gegenstand der Erfindung illustrieren und stellen keine Einschränkung der Erfindung dar.

20

Beispiel 1: Herstellung des Primers nach Formel IIa

Der Primer nach Formel IIa wird mit dem DNA-Synthesizer 380A von Applied Biosystems nach der Phosphoamidit-methode hergestellt. Die Grundzüge der Methode ist in Tetrahedron Lett. (1981) 22 : 1859-1862, beschrieben. Weitere Einzelheiten finden sich in der Dokumentation des Geräteherstellers.

Entsprechend werden die Primer nach Formel IIc, IIId, IIIf, IIg und IIh hergestellt. Die Primer nach Formel IIb und IIe werden in der jeweiligen Komplementärsequenz (Komplementärsequenz von IIb: TATGAATTCTACGCGACCGAAGCCAA; IIe: GCACTTGAATTGCTGTTATTG) hergestellt.

**Beispiel 2: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen
Nachweis von *L. monocytogenes***

5 Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl
Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl)
suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend
werden Primer nach Formel IIId und IIe (siehe Beispiel 1; je
0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst
in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und
10 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP
zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste
Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend
wird für 30 Sekunden auf 55 °C (Bindungsphase) und für eine
Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden
15 Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30
Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt
(bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

20 Die PCR-Produkte werden in einem Polyacrylamid-Gel (6 %) in
einem Lauffuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM)
aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Pro-
dukte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Was-
ser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar
gemacht.

25 Nur wenn DNA oder Zellen von *L. monocytogenes* in der Probe
vorhanden sind, werden PCR-Produkte beobachtet (siehe Spalte
A in Tabelle 1).

30

Beispiel 3: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes*

Das in Beispiel 2 beschriebene Verfahren wird unter Verwendung der Primer nach Formel IIId und IIb (siehe Beispiel 1) anstelle der Primer nach Formel IIId und IIe wiederholt. Auch in diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von *L. monocytogenes* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte B in Tabelle 1).

10

Beispiel 4: Durchführung der PCR-Reaktion zum genusspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIc und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 30 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase) und für zwei Minuten auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

In diesem Fall werden PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien der Gattung *Listeria* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte D in Tabelle 1).

5 **Beispiel 5 Durchführung der PCR-Reaktion zum gruppenspezifischen Nachweis von Listerien**

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt.

10 Anschließend werden Primer nach Formel II f und II b (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl).

15 Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 58 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender
20 Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte
25 durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

In diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA
30 oder Zellen von Bakterien aus der Gruppe *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte E in Tabelle 1).

**Beispiel 6: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen
Nachweis von *L. innocua***

5 Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl
Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl)
suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend
werden Primer nach Formel IIg und IIb (siehe Beispiel 1; je
0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst
in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und
10 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP
zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste
Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend
wird für 60 Sekunden auf 62 °C (Bindungsphase) und für 45
Sekunden auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgen-
15 den Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden.
Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongations-
schritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

20 Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem
Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufge-
trennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte
durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser)
angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar
gemacht.

25 Nur wenn DNA oder Zellen von *L. innocua* in der Probe vorhan-
den sind, werden PCR-Produkte beobachtet (siehe Spalte C in
Tabelle 1).

30

Beispiel 7: Durchführung der PCR-Reaktion zum gruppenspezifischen Nachweis von Listerien

5 Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl
Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt.
Anschließend werden Primer nach Formel IIh und IIb (siehe
Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa.
Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5;
1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP,
10 dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl).
Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C.
Anschließend wird für 45 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase)
und für 45 Sekunden auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert.
Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45
15 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender
Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

20 Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem
Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufge-
trennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte
durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser)
angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar
gemacht.

25 In diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA
oder Zellen von Bakterien aus der Gruppe *L. grayi* und *L.*
murrayi in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte G in
Tabelle 1).

30

Beispiel 8: Durchführung einer kombinierten PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes* und von *L. innocua* und zum gruppenspezifischen Nachweis der Gruppen *L. ivanovii* / *L. seeligeri* / *L. welshimeri* und *L. grayi* / *L. murrayi*

5

10

15

20

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend wird eine Mischung von Primern nach Formel IIId, IIIf, IIg, IIh, sowie IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

25

30

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Zusätzlich wird eine Nukleinsäuremischung (beispielsweise das Produkt aus der Spaltung von SspI Phagen DNA mittels Restriktionsendonuklease EcoRI) als Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

Das Vorhandensein von DNA oder Zellen von Bakterien aus der Art *L. monocytogenes*, der Art *L. innocua*, der Gruppe *L. ivanovii* / *L. seeligeri* / *L. welshimeri* oder der Gruppe *L. grayi* / *L. murrayi* kann auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte differenziert werden (siehe Spalte H in Tabelle 1, sowie Figur 1).

Beispiel 9: Synthese des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

Für die Synthese des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu wird das f_{moc} -Verfahren (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe) benutzt. Dieses Peptid entspricht einem Peptid der Formel IVd mit einem zusätzlichen N-terminalen Cysteinrest als Linker. Für die Synthese wird ein Peptid-Synthetizer der Fa. Applied Biosystems benutzt, die Prozessparameter sind in der Gerätedokumentation enthalten.

Ein polymerer Träger mit 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)-phenoxygruppen dient als Festphase. Die Aminosäuren werden als α -N- f_{moc} -Derivate eingesetzt. Soweit die Aminosäuren reaktive Seitengruppen enthalten, werden diese durch zusätzliche Schutzgruppen, die durch Trifluoressigsäurehydrolyse abspaltbar sind, maskiert. Die Peptidbindungen werden durch Aktivierung der Carboxylgruppen mittels Diisopropylcarbodiimid hergestellt. Die Reihenfolge der eingesetzten Aminosäurederivate ergibt sich aus der gewünschten Sequenz.

Im ersten Schritt des Synthesesyklus reagiert die Aminogruppe an der Festphase, d.h. im ersten Zyklus die Aminogruppen des 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)-phenoxyrests des

Trägers, in den folgenden Zyklen die α -Aminogruppe der zuletzt angefügten Aminosäure, mit den Carboxylgruppe der nächsten Aminosäure, die als α -N-f_{moc}-Derivat, gegebenenfalls mit geschützten Seitenketten eingesetzt wird, und die durch Diisopropylcarbodiimid aktiviert wird. Nicht umgesetzte Aminosäurederivate werden mit Dimethylformamid ausgewaschen. Anschließend wird die f_{moc}-Gruppe durch Behandeln mit 20 % (V/V) Piperidin in Dimethylformamid abgespalten. Die übrigen Schutzgruppen bleiben bei dieser Reaktion unverändert. Mit der Entfernung der α -N-Schutzgruppe kann der nächste Reaktionszyklus beginnen. Nachdem die letzte Aminosäure entsprechend der vorgesehenen Sequenz zugefügt worden ist, werden die Schutzgruppen der Seitenketten und die Bindung zum Trägerharz durch saure Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure gespalten. Das Peptid wird anschließend durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt.

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise werden auch die übrigen Peptide mit den erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert.

Beispiel 10: Konjugation des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaPro-LysAlaProThrGlu mit Glucosedehydrogenase

a) Derivatisierung der Glucosedehydrogenase:

30 mg Glucosedehydrogenase aus Bacillus megatherium Fa. Merck, Art.Nr. 13732) werden in 4 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 8,0) gelöst. Zu 2,4 ml dieser Lösung werden 6,78 mg N- γ -Maleimidobutyryloxysuccinimid (Fa. Calbiochem) gelöst in 50 μ l Dimethylsulfoxid zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Anschließend wird das überschüssige N- γ -Maleimidobutyryloxysuccinimid durch Gelfiltration an PD-10 (Fa. Pharmacia) chromatographisch abgetrennt. Nach der Chromatographie erhält man 3,5 ml Lösung des aktivierten Trägerproteins mit einer Konzentration von 4,5 mg/ml.

b) Kopplung mit dem Peptid:

Zu 1,1 ml der Lösung aus dem obigen Schritt werden 5,2 mg des Peptides, hergestellt nach Beispiel 9, gelöst in 1 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 7,0) zugefügt und 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird das nicht gebundene Peptid durch Gelfiltration an PD-10 (Fa. Pharmacia) chromatographisch abgetrennt. Nach der Chromatographie erhält man 3,5 ml Lösung des Konjugates mit einer Konzentration von 2,3 mg/ml.

Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise werden auch Konjugate mit den anderen Peptiden entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt.

Beispiel 11: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

Zwei Kaninchen werden jeweils mit einer Emulsion aus 0,18 ml Konjugat aus Beispiel 10, 0,07 ml phosphatgepufferter Saline und 0,25 ml Öladjuvans (MISA 50, Fa. Seppic, FR) i.m. injiziert. Drei, fünf und sieben Wochen nach der Erstinjektion erfolgen Boosterinjektionen mit gleicher Menge. Eine Woche nach der letzten Injektion werden die Tiere getötet und

ausgeblutet. Nachdem das Blut geronnen ist, wird das Antiserum durch Zentrifugation gewonnen und Natriumazid bis zu einer Endkonzentration von 0,02 % zugefügt. Das Antiserum wird bei -20 °C eingefroren gelagert.

5

Beispiel 12: Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

10 Zwei Mäuse werden jeweils mit einer Emulsion aus 0,1 ml Konjugat aus Beispiel 10 und 0,1 ml Öladjuvans (MISA 50, Fa. Seppic, FR) s.c. injiziert. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Erstinjektion erfolgen Boosterinjektionen mit gleicher Menge. Drei Tage nach der letzten Injektion werden die Tiere getötet und die Milz isoliert. Die Zellen aus der Milz werden
15 nach üblichen Verfahren isoliert und mit einer permanenten murinen Zelllinie fusioniert. Aus den Fusionsprodukten werden Zelllinien selektioniert, die Antikörper gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu bilden.

20 **Beispiel 13: Immunologischer Nachweis von L. monocytogenes**

a) Vorkultur und Zentrifugation der Bakterien:

25 10 ml CASO-Bouillon werden mit Material aus mehreren Kolonien von L. monocytogenes angeimpft und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wird je 1 ml der Kultur entnommen. Die Bakterienzellen werden abzentrifugiert (13000 UpM; 5 Min.).

30

b) Identifizierungsreaktion:

Je 300 µl der Überstände aus dem vorigen Arbeitsschritt werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wird
5 je dreimal mit je 100 µl Waschlösung (9 g/l NaCl und 0,05 % Tween 20 in Wasser) gewaschen. In die Vertiefungen werden nun je 100 µl Antiserum hergestellt nach Beispiel 11 pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird erneut je dreimal mit je 100 µl Waschlösung gewaschen. Dann werden in jede Vertiefung je
10 100 µl mit alkalischer Phosphatase markierter anti-kaninchen Antikörperlösung (Art.Nr. A 8025; Fa. Sigma) pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die
15 Vertiefungen werden erneut mit je 100 µl Waschlösung gewaschen und anschließend der gebundene enzymmarkierte Antikörper nachgewiesen. Dazu werden 200 µl einer Pufferlösung mit Substrat (Art.-Nr. 14001, Fa. Merck) eingefüllt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
20 Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 µl 2 N NaOH-Lösung (Art.Nr. 9136, Fa. Merck) abgestoppt und das Reaktionsprodukt sichtbar gemacht. Eine gelborange Färbung zeigt die Anwesenheit von *L. monocytogenes* an.

25 **Beispiel 14: Spezifischer Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Immunoblot**

Bakterien werden wie in Beispiel 13a) beschrieben vorkulti-
viert und die Zellen abzentrifugiert. Die abzentrifugierten
30 Zellen werden in 1 ml phosphatgepufferter Saline aufgenommen und suspendiert. 2 µl dieser Suspension werden auf eine

Nitrocellulosemembran (Hybond C, 0,45 μ m, Art.Nr. RPN 283 C, Fa. Amersham) pipettiert. Nachdem die Lösung eingetrocknet ist, wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (10 g/l) in phosphatgepuffert

5 pufferter Saline behandelt. Es wird eine Verdünnung (1:200) des in Beispiel 11 erhaltenen Antiserums mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (10 g/l) und Tween 20 (0,5 g/l) in phosphatgepuffert

10 erter Saline (Antikörperlösung A), sowie eine weitere Verdünnung (1:500) von peroxidasemarkiertem anti-Kaninchen Antikörper (anti Rabbit IgG, Art.Nr. 68-397; Fa. ICN Immuno Biologicals) mit demselben Verdünnungsmittel (HRP-Antikörperlösung) vorbereitet. Die Membran wird eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung A inkubiert und anschließend dreimal mit phosphatgepuffert

15 erter Saline mit 0,05 % Tween 20 gewaschen. Um die Antikörperbindung nachzuweisen, wird die Membran anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit HRP-Antikörperlösung inkubiert und je dreimal mit a) Tween 20 (0.5 g/l) in phosphatgepuffert

20 erter Saline, b) mit phosphatgepuffert

erter Saline und c) mit TRIS-Puffer (50 mM; pH 7,4; mit 200 mM NaCl) gewaschen. Für die Farbreaktion wird eine Lösung von 4-Chloro-1-naphthol (3 mg/ml in Methanol) mit fünf Volumen TRIS-Puffer (50 mM; pH 7,4; mit 200 mM NaCl) verdünnt und Wasserstoffperoxid zugesetzt (Endkonzentration 0,1 g/l). Die Membran wird in dieser

25 Substratlösung inkubiert. Eine blauschwarze Färbung zeigt L. monocytogenes an.

**Tabell 1: Spezifität der Polymerase-Ketten-Reaktion bei
Verwendung verschiedener Primer entsprechend
Formel IIa-IIh**

5	Kombination:	A	B	C	D	E	F	G	H
	Primer 1:	IIId	IIId	IIg	IIc	IIIf	IIa	IIh	M ³⁾
	Primer 2: ¹⁾	IIe	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb
	untersuchte Reaktion								
10	Bakterien:								
	L. monocytogenes								
	Serovar 1/2a EGD	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 1/2a Mack. ²⁾	+	+	-	+	-	+	-	+
15	Serovar 1/2b	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 1/2c	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 3a	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 3b	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 3c	+	+	-	+	-	+	-	+
20	Serovar 4a	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4ab	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4b	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4c	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4d	+	+	-	+	-	+	-	+
25	Serovar 4e	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 7	+	+	-	+	-	+	-	+
	L. ivanovii	-	-	-	+	+	+	-	+
	L. seeligeri	-	-	-	+	+	+	-	+
	L. innocua								
30	Serovar 6a	-	-	+	+	-	+	-	+
	Serovar 6b	-	-	+	+	-	+	-	+
	Serovar 4ab	-	-	+	+	-	+	-	+

Kombination:	A	B	C	D	E	F	G	H
Primer 1:	IIId	IIId	IIg	IIc	IIIf	IIa	IIh	M ³⁾
Primer 2: ¹⁾	IIe	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb

5 untersuchte Reaktion

Bakterien:

	L. welshimeri	-	-	-	+	+	+	-	+
	L. murrayi	-	-	-	+	-	+	+	+
10	L. grayi	-	-	-	+	-	+	+	+
	Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	+	-	-
	Bacillus cereus	-	-	-	-	-	+	-	-
	Micrococcus flavus	-	-	-	-	-	+	-	-

15 Legende:

+ PCR-Produkt nachgewiesen

- kein PCR-Produkt nachweisbar

1) komplementäre Sequenz

2) Mack.: Stamm Machaness

20 3) M: Mischung aus Primern nach Formel IIId, IIIf, IIg und IIh;
Amplifikationsprodukte können aufgrund des Molekularge-
wichtes differenziert werden.

25

30

Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung

6100 D a r m s t a d t

5

Patentansprüche

1. Primer, ausgewählt aus dem iap-Gen (invasion associated
protein), für die Amplifikation von Nukleinsäuren,
gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln
Va bis Vh und/oder einer zugehörigen Komplementärsequenz,

	X ¹ AATATGAAAAAGCX ²	Va
15	X ¹ GCTTCGGTCGCGTAX ²	Vb
	X ¹ ACAGCTGGGATTGCX ²	Vc
	X ¹ ACTGCTAACACAGCTX ²	Vd
	X ¹ TAACAGCAATTCAAGX ²	Ve
	X ¹ CTGAGGTAGCGAGCX ²	Vf
20	X ¹ AGCACTCCAGTTGTTAX ²	Vg
	X ¹ GCAGTTTCTAAACCTX ²	Vh

worin

- 25 X¹ und X² jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff,
ein beliebiges Nukleotid oder ein beliebiges
Oligonukleotid mit bis zu 20 Nukleotidbau-
steinen

- 30 bedeuten.

2. Primer, gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln IIa bis IIh.

5	GTCGACTGAATATGAAAAAAGCAAC	IIa
	TTGGCTTCGGTCGCGTAGAATTCATA	IIb
	GCTACAGCTGGGATTGCGGT	IIc
	CAAAGTCTAACACAGCTACT	IIId
	CAATAACAGCAATTCAAGTGC	IIe
	TAACTGAGGTAGCGAGCGAA	IIIf
10	ACTAGCACTCCAGTTGTAAAC	IIg
	CCAGCAGTTTCTAAACCTGCT	IIh

3. Peptid, ausgewählt aus dem Protein p60, gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln VIa bis VIId,

15

	X ³ SerThrProValAlaProThrX ⁴	VIa
	X ³ ThrGlnAlaThrThrProAlaProLysValX ⁴	VIb
	X ³ AlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAlaX ⁴	VIc
20	X ³ GlnGlnThrAlaProLysAlaProThrX ⁴	VI

worin

25 X³ und X⁴ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff,
eine beliebige Aminosäure oder ein beliebiges
Oligopeptid mit bis zu 7 Aminosäuren

bedeuten.

30

4. Peptid nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch eine Sequenz nach einer der Formeln IVa bis IVf.

	ValSerThrProValAlaProThrGln	IVa
5	ThrThrGlnAlaThrThrProAlaProLysValAla	IVb
	LeuAlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAlaThr	IVc
	GlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu	IVd
	SerThrProValAlaProThrGlnGluValLysLys	IVe
	ProValAlaProThrGlnGluValLysLys	IVf

10

5. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 3-4 zur Herstellung von immunogenen Konjugaten.

15

6. Antikörper, der spezifisch gegen ein Isotop gerichtet ist, welches von einem Peptid nach einem der Ansprüche 3-4 gebildet wird.

20

7. Verwendung eines Primers nach einem der Ansprüche 1-2 für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

25

8. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels Nukleinsäureamplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß ein Primer nach einem der Ansprüche 1-2 verwendet wird.

30

9. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 6 für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.
10. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels einer Immunreaktion, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper nach Anspruch 6 verwendet wird.

11. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* mittels Polymerase-Ketten-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß darin ein Primer nach einem der Ansprüche 1-2 enthalten ist.

5

12. Testzusammenstellung nach Anspruch 11 zum Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes*.

10

13. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* mittels Immunoassay, dadurch gekennzeichnet, daß darin ein Antikörper nach Anspruch 6 enthalten ist.

15

20

25

30

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere von *L. monocytogenes*. Zu den erfindungsgemäßen Mitteln gehören Primer, deren Sequenz aus dem *iap*-Gen von *L. monocytogenes* ausgewählt ist. Weiterhin gehören zu den erfindungsgemäßen Mitteln Peptide, deren Sequenz aus dem p60-Protein ausgewählt ist, und die geeignet sind, spezifische Antikörper für den immunologischen Nachweis von *L. monocytogenes* zu erzeugen.

15

20

25

30

Fig. 1

